

Ephedra equisetina Bunge 及び

近縁植物の種分類と多様性に関する研究

安藤 広和

平成 27 年 3 月

博 士 論 文

Ephedra equisetina Bunge 及び

近縁植物の種分類と多様性に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
創薬科学専攻
分子生薬学研究室

学 籍 番 号	1229012001
氏 名	安藤 広和
主任指導教官名	佐々木 陽平

目次

序論	1
<i>Ephedra</i> 属植物の外部形態的特徴及び実験材料	4
本論	
第一章 <i>Ephedra equisetina</i> 及び近縁植物の DNA 解析	
緒言	14
第一節 実験方法	15
第二節 実験結果	15
第三節 考察	23
第二章 <i>E. equisetina</i> 及び <i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> のアルカロイド分析	
緒言	26
第一節 実験方法	29
第二節 実験結果	30
第三節 考察	34
総論	35
実験の部	37
引用文献	44
謝辞	48

序論

マオウ科 (Ephedraceae) *Ephedra* 属植物は、ユーラシア大陸、アフリカ大陸北部、アメリカ大陸西部の乾燥地帯に約 50 種類自生する分類群で¹⁾、中国には *Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer, *E. equisetina* Bunge など 14 種が自生している²⁾。 *Ephedra* 属植物は外部形態的な分類形質が少なく、種分類が困難な一群であるため、種の位置づけが常に議論されている。例えば、中国に自生する *E. sinica* と ヨーロッパからアジアにかけて広く分布する *E. distachya* L. は分類学的に意見が分かれていたが、Ni らによる分子生物学的研究により、これらは別種にするべきであると報告された³⁾。また、*E. sinica* と *E. dahurica* Turcz. との関係は Kakiuchi らによって同じ分類群であることが報告された⁴⁾。一方で、*E. equisetina* とユーラシア大陸西部に分布する *E. major* Host ssp. *procera* (C.A.Mey.) Bornm. においても形態学的特徴が類似しているため、分類群の区別は不確かで混乱している⁵⁾。中国植物誌の *E. equisetina* の項目には「本种的木质茎较高大，在外形上与树状麻黄 *E. procera* Fisch. et Mey. 及南欧麻黄 *E. nebrodensis* Tineo 极为相似，在分类工作中因之也常有合并，分开及误定的情况。」との記載があり⁶⁾、*E. major* ssp. *procera* (= *E. procera*) は *E. equisetina* のシノニムとして判断される場合がある。すなわち *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の両分類群は、それぞれが形態的な多様性を示し、このことが種分類を困難にしている。

Ephedra 属植物の中には地上茎が薬用として使用可能なものがある。日本では、第十六改正日本薬局方 (JP16) に、*Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A. Meyer, *E. equisetina* Bunge の 3 種に由来する生薬麻黄が収載されている⁷⁾。安定した品質のためには厳格な種の同定が要求されており、種分類は必要不可欠である。

麻黄は、発汗、解熱、鎮咳などの目的で、葛根湯や麻黄湯などの漢方処方に配合されている。また、特徴的な含有成分としてアルカロイドが知られており、エフェドリンをはじめ、プソイドエフェドリン、ノルエフェドリン、ノルプソイドエフェドリン、メチルエフェドリンなどがある。JP16 には総アルカロイド (エフェドリン及びプソイドエフェドリン) 0.7%以上を含むと規定されている⁷⁾。麻黄の原植物は日本に自生していないため、資源は全て中国に依存して

いる。平成 22 年度の原料生薬使用量等調査報告書では、麻黄の使用量は 563,735 kg であり、その全てを中国から輸入していると報告している⁸⁾。しかし、中国では資源の保護、砂漠化防止のため、1999 年より未加工品の麻黄の輸出規制を行っている⁹⁾。その為、現在麻黄の供給は常に不安定な状態にある。

原料の確保が課題となっている生薬品目は麻黄だけではない。国内では漢方薬の需要が高まり、漢方製剤の生産金額は、平成 20 年から平成 24 年までの 5 年間で 1.19 倍になっている（医薬品全体は 1.05 倍）¹⁰⁾が、漢方製剤の原料となる生薬は 81%を中国から輸入しており、国内での生産は 12%程度しかない⁸⁾。このような中国に依存した生薬原料の供給体制を改善する為、新たな生薬資源の確保が課題となっている。その具体的な 2 つの選択肢は、①日本での原植物の栽培化、②中国以外の地域における代替種の開発、である。①について、厚生労働省、農林水産省、日本漢方生薬製剤協会が主体となって、薬用作物の産地化に向けたブロック会議が平成 25 年から開催されている¹¹⁾。また、農林水産省は平成 26 年度予算要求として初めて薬用作物等の産地確立支援事業を決定するなど¹²⁾、生薬の国内生産に向けた動きが活発になっている。

麻黄に関しては、①について、現在国内で原植物の試験栽培が行われている¹³⁾が、種苗の確保や、JP16 規定の総アルカロイド 0.7%を満たす麻黄を安定的に生産する事が大きな課題となっており、栽培法が確立していない状況にある。また、国内栽培では、中国からの輸入に比べ生産コストが高く、普及するには価格面での問題もある。

②について、昭和 20-30 年代に中国からの輸入が途絶え、麻黄の供給が不安定になったが、この際は、パキスタンやロシアなどから輸入されていた^{14, 15)}。現在でも②に関する検討の余地は大きく残されていると言える。すなわち、中国以外の国からの輸入や、JP16 規定種以外の利用などを検討することによって多方面にわたる供給地が確保できる。そこで、広範囲に分布する麻黄の JP16 規定種以外の利用を見据えて *Ephedra* 属植物の種分類を検討した。

本研究では、生薬麻黄の多方面にわたる供給地を確保することを目指し、*E. equisetina* 及び近縁植物の種分類と多様性を解明することを目的とした。JP16 によって規定される生薬麻黄には、*E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* の 3 種以外の植物の使用が認められない。しかし冒頭に記載のとおり、種の位置づけが困難な *Ephedra* 属植物において、*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* のように区別が確定していない種類がある。仮に両種が種として区別し得ない場合、*E. major* ssp. *procera* の地上茎に由来する生薬も麻黄として利用できる可能性がある。実際、*E. equisetina* について、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に複数の配列多型が登録されていることや、形態的な変異を有することを考慮すると、種内で大きな多様性を有する分類群であることが推察される。すなわち、*E. major* ssp. *procera* は *E. equisetina* の種内の多様性に含まれる可能性が充分にある。この場合、*E. major* ssp. *procera* はユーラシア大陸西部に広く分布することから、麻黄の資源供給地の選択肢が大きく広がることになる。

本論文第一章では、*Ephedra* 属植物の ITS1 領域、*trn K* 遺伝子の DNA 配列を解析する事によって *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の種分類を明らかにし、*E. major* ssp. *procera* が麻黄の原植物として代替・補完が可能か検討した。

第二章では、主要成分であるエフェドリン系アルカロイド (エフェドリン (E), プソイドエフェドリン (PE), ノルエフェドリン (NE), ノルプソイドエフェドリン (NPE), メチルエフェドリン (ME)) の定量を行う事によって含有成分的に *E. major* ssp. *procera* が生薬麻黄としての基準を満たすか検討すると共に、アルカロイドの組成に関して、種、産地ごとの特徴を精査した。

Ephedra 属植物の外部形態的特徴及び実験材料

関連する *Ephedra* 属植物の外部形態的特徴を Table 1 に示した.

植物検体は 2002 年～2012 年にかけて中国及びモンゴルにて採集した *E. equisetina* 57 検体, 2012 年にトルコにて採集した *E. major* ssp. *procera* 23 検体, フランスにて採集した *E. major* ssp. *procera* 1 検体である. 中国, モンゴル及びトルコ産の植物検体の採集及び同定は金沢大学御影雅幸名誉教授, フランス産の植物検体の採集及び同定はパリ博物館の Dr. Nathalie Allain によって行われた. 本研究に使用した植物検体の詳細を Table 2 に, 採集地点を Fig. 1 に示した.

E. equisetina Bunge



同じ場所に赤色の毬果を付けた株と、黄色の毬果を付けた株が混在している.

撮影地：新疆ウイグル自治区

中国（甘肅省，河北省，内蒙古自治区，寧夏回族自治区，青海省，陝西省，新疆ウイグル自治区），アフガニスタン，カザフスタン，キルギスタン，モンゴル，ロシア，タジキスタン，トルクメニスタン，ウズベキスタンの 800-3000 m の乾燥した岩場に自生している²⁾，高さ約 150 cm の小灌木である²⁾．地上茎は多数分枝し¹⁶⁾，細く（1 mm 未満）²⁾，表面は滑らか¹⁶⁾で灰緑色²⁾．毬果は赤色の漿質で単生し，腋生．短い果柄があり，苞片は 3 対²⁾．珠孔管は 2 mm，直線的，または僅かに湾曲する²⁾．また，含有成分に関しては，アルカロイド含量が高く，アルカロイドの組成はエフェドリンが最も多いと報告されている¹⁷⁾．一般的な *Ephedra* 属植物の特徴として毬果に 2 つの種子をつくるが，*E. equisetina* は 1 つの種子しか作らない²⁾．また，これまでに核 DNA や，葉緑体 DNA を用いた遺伝子の解析が行われており，DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にはいくつかのジェノタイプが登録されている．

JP16 に収載されている麻黄原植物 3 種の中で，最もアルカロイド含量が高いとされている¹⁸⁾．

E. major Host ssp. *procera* (C.A.Mey.) Bornm.



E. equisetina と同様に、赤色の毬果を付けた株と黄色の毬果を付けた株がある。

撮影地：トルコ

E. major にはいくつかの亜種が報告されている。基準亜種である *E. major* ssp. *major* の分布域は局所的で、主に地中海の西側に分布している⁵⁾。地上茎が直立し、太く (2-3 mm)、表面が粗糙で灰緑色-黄緑色である⁵⁾。葉は若い部分に残り、毬果は無柄-半無柄で、2-5 節につく⁵⁾。苞片は 3 対で、まれに 4 対である⁵⁾。一方、*E. major* ssp. *procera* の分布域は広く、ヨーロッパ西部や、地中海の西側から中央アジアにかけて分布している⁵⁾。地上茎は枝分かれが多く、細く (約 1 mm)、表面が滑らかであり緑色⁵⁾。葉は接合し、古くなると裂けて、背面が黒-茶色になる⁵⁾。毬果は赤色の漿質で単生し、腋生。短い果柄があるが (1 cm 以下)、無柄のものもある⁵⁾。苞片は 3 対⁵⁾、種子を 1 個包蔵¹⁹⁾。また、含有成分に関しては、アルカロイド含量が高く、2.5%以上のアルカロイドを含有し、その 75%をエフェドリンが占めるとの報告もある²⁰⁾。

JP16 の麻黄の原植物には規定されていない。トルコでの薬用としての使用経験がある^{21),22)}。

E. sinica Stapf



中国（甘肅省，河北省，黒竜江省，吉林省，遼寧省，内蒙古自治区，寧夏回族自治区，陝西省，山西省），モンゴルの 700-1600 m の砂状の平地，または山の傾斜地に自生している高さ 40 cm の小灌木である²⁾．地上部の木化は少なく，草質茎の分枝は少ない²⁾．直径約 2 mm²⁾，表面は粗糙で帯白藁緑色¹⁶⁾．節間は 2.5-5.5 cm²⁾．毬果は赤色の漿質で単生し，頂生または最長部節に腋生，苞片は 4 対²⁾．種子を 2 個包蔵²⁾．珠孔管は 1-2 mm，直線的，または僅かに湾曲する²⁾．

JP16 に収載されている麻黄原植物 3 種の中で主に使用されている種である．

E. intermedia Schrenk et C.A.Meyer



中国（甘肅省，河北省，遼寧省，内蒙古自治区，寧夏回族自治区，青海省，陝西省，山東省，山西省，新疆ウイグル自治区，チベット自治区），アフガニスタン，カザフスタン，キルギスタン，モンゴル，パキスタン，ロシア，タジキスタン，トルクメニスタン，ウズベキスタンの 800-4600 m の草原，砂漠，川，谷，冠水地帯，砂浜，崖，など乾燥した砂または岩場に自生している高さ 100 cm の小灌木である²⁾。地上部の分枝が多く，まれに根茎を伸ばし成長する²⁾。地上茎は緑色または，黄緑色や青緑色²⁾。節間は 2-6 cm，直径約 1.5-3.5 mm²⁾。3 枚の葉を輪生，または対生する²⁾。毬果は赤色の漿質で 2-3 個の対生または輪生，無柄または短い果柄がある²⁾。苞片は 2-5 対。種子を 2 個包蔵²⁾。珠孔管は長く（2-5 mm），螺旋状に巻いている²⁾。

JP16 に収載されている麻黄原植物 3 種のひとつ。

	毬果			種子		
	性状	苞片	色	珠孔管	種子	
<i>Ephedra equisetina</i>	対生, 腋生, 短い果柄 ²⁾	3 対 ²⁾	赤, 漿質 ²⁾	2 mm, 直線的または僅かに湾曲 ²⁾	1 個 ²⁾	
<i>E. major</i> ssp. <i>major</i>	2 個以上が対生または輪生, 無柄または半無柄 ⁵⁾	3-対 ⁵⁾	赤, 漿質		1 個	
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i>	単生, 短い果柄またはは無柄 ⁵⁾	2-3 対 ⁵⁾	赤, 漿質	2.5 mm 長く直線的 ¹⁹⁾	1 個 ¹⁹⁾	
<i>E. sinica</i>	単生, 頂生または腋生 ²⁾	4 対 ²⁾	赤, 漿質 ²⁾	1-2 mm, 直線的, 僅かに湾曲 ²⁾	2 個 ²⁾	
<i>E. intermedia</i>	2-3 個の対生またはは輪生, 無柄またはは半無柄 ²⁾	2-5 対 ²⁾	赤, 漿質 ²⁾	3-5 mm, 長く螺旋状 ²⁾	2-3 個 ²⁾	
<i>E. gerardiana</i>	単生, 無柄またはは半無柄 ²⁾	2-3 対 ²⁾	赤, 漿質 ²⁾	1 mm, 短い ²⁾	1-2 個 ²⁾	
<i>E. monosperma</i>	単生またはは対生, 無柄またはは半無柄 ²⁾	2-3 対 ²⁾	赤, 漿質 ²⁾	1.5-2 mm, 湾曲またはは直線的 ²⁾	1-2 個 ²⁾	

	地上茎							備考
	高さ	形	表面	太さ	節間	木化	色	
<i>Ephedra equisetina</i>	150 cm ²⁾	分枝が多い ¹⁶⁾	平滑 ¹⁶⁾	1-1.5 mm ²⁾	1-3 cm ²⁾	強い ²⁾	青緑色-灰緑色 ²⁾	JP16 に記載されており, 最もアルカロイド含量が高い.
<i>E. major</i> ssp. <i>major</i>	200 cm ²⁷⁾	直立(分枝が少ない) ⁵⁾	粗糙 ²⁷⁾	2-3 mm ⁵⁾			灰緑色-黄緑色 ⁵⁾	<i>E. major</i> の基準亜種
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i>	150 cm ¹⁹⁾	分枝が多い ⁵⁾	平滑 ²⁷⁾	1 mm ⁵⁾		強い	緑色 ⁵⁾	<i>E. equisetina</i> との区別が混乱している.
<i>E. sinica</i>	40 cm ²⁾	低密度に分枝 ²⁾	粗糙 ¹⁶⁾	2 mm ²⁾	2.5-5.5 cm ²⁾	弱い ²⁾	帯白堊緑色	JP16 に記載され, 現在主に使用されている.
<i>E. intermedia</i>	100 cm ²⁾	高密度に分枝 ²⁾	粗糙 ¹⁶⁾	1.5-3.5 mm ²⁾	2-6 cm ²⁾		黄緑色-青緑色 ²⁾	JP16 に記載されている.
<i>E. gerardiana</i>	15 cm ²⁾	分枝が少ない ⁶⁾	粗糙 ²⁾	1.5-2 mm ²⁾	1-2 cm ²⁾	強い ²⁾	暗緑色-淡褐色 ²⁾	ITS 領域の塩基配列が <i>E. equisetina</i> と相同性が高い.
<i>E. monosperma</i>	15 cm ²⁾	分枝が多い ²⁾	平滑 ¹⁶⁾	1 mm ²⁾	1-3 cm ²⁾	強い ²⁾	緑色 ²⁾	ITS 領域の塩基配列が <i>E. equisetina</i> と相同性が高い.

Table 1. Morphological features of *Ephedra* plants

Fig. 1 Collection site



▼ : *E. equisetina* の採集地

▼ : *E. major* ssp. *procera* の採集地 genotype M-1 (後述)

▼ : *E. major* ssp. *procera* の採集地 genotype M-2 (後述)

Table 2. Specimens used in this study

種	採集地	採集日	標本番号
<i>E. equisetina</i>	Qinggil, Xinjiang, China	2012.7.10	71031
			71032
			71033
			71034
			71037
			71038
	Fuyun, Xinjiang, China	2012.7.11	71121
			71122
			71123
			71124
		2012.7.12	71201
			71202
			71203
			71204
		2012.7.13	71301
			71302
	Kumul, Xinjiang, China	2006.6.27	06C3024
			06C3025
	Qinggil, Xinjiang, China	2006.6.30	06C3046
	Fuyun, Xinjiang, China	2006.6.30	06C3047
			06C3048
			06C3049
	Altay, Xinjiang, China	2006.6.30	06C3051
			06C3056
			06C3057
	Jeminay, Xinjiang, China	2006.7.1	06C3062
			06C3063
	Ili Kazakh, Xinjiang, China	2006.7.4	06C3091
			06C3092

Table 2. Continued

種	採集地	採集日	標本番号
<i>E. equisetina</i>	Xinyuan, Xinjiang, China	2006.7.5	06C3094
			06C3095
	Fukang, Xinjiang, China	2006.7.14	06C3138
	Zhangjiakou, Hebei, China	2002.6.8	02136
	Zhangjiakou, Hebei, China	2002.7.27	02612-1
			02612-2
			02612-3
	Xunhua, Qinghai, China	2002.7.30	02303-1
			02303-2
			02304
			02305
	Xining, Qinghai, China	2002.8.1	02314
	Shandan, Gansu, China	2002.8.11	02356
	Gulang, Gansu, China	2002.8.12	02359
	Bayan Nur, Inner Mongolia, China	2009.8.15	90815102
			90815103
	Bayan Nur, Inner Mongolia, China	2009.8.15	90815104
			90815105
			90815106
	Alxa Zuoqi, Inner Mongolia, China	2010.7.22	1007221
			1007222
			1007224
			1007226
			1007227
			1007228
	Bayanhongor District, Mongolia	2005.7.31	20531022
			20531023
	Dundgovi District, Mongolia	2005.8.4	20531051

Table 2. Continued

種	採集地	採集日	標本番号
<i>E. major ssp. procera</i>	Karadiken, Turkey	2012.3.30	U120330
	Kaiseri, Turkey	2012.6.20	U120620
		2012.6.29	U62921
			U62922
			U62923
	Kirikkale, Turkey	2012.6.29	U62901
			U62902
			U62903
			U62904
			U62905
			U62906
	Cappadocia, Turkey	2012.6.30	U63001
			U63002
			U63003
			U63004
			U63005
			U63006
			U63007
			U63008
			U63009
			U63010
	Ankara, Turkey	2012.7.1	U70101
			U70102
	Provence, France	2012.9.3	U20120929-1*

The specimens were collected and identified by Prof. M. Mikage and Dr. Nathalie Allain.

*: Dr. Nathalie Allain

The other specimens: Prof. M. Mikage

本論

第一章 *Ephedra equisetina* 及び近縁植物の DNA 解析

緒言

Ephedra 属植物は、毬花、地上茎、鱗片葉などによって分類されるが、このような外部形態的特徴は生育環境によって大きく変化する事が知られており、種分類が混乱する要因となっている。近年、DNA 配列を利用した分子系統学的解析から系統関係の推定が行われており、特に *Ephedra* 属植物は植物体の構造が単純で、種分類が非常に困難な一群であるため積極的に行われている。Kakiuchi ら⁴⁾は、核 ITS 領域および葉緑体 *trn* L/F 領域を用いて、Kitani ら²⁶⁾は核 18S rRNA 遺伝子領域および ITS1 領域、葉緑体 *trn* K 遺伝子を用いて *Ephedra* 属植物の系統解析や遺伝子多型の解析を報告している。これまでの報告では、DNA 解析により *E. equisetina* と *E. sinica*, *E. intermedia* についての種分類が明らかとなっている²⁷⁾。*E. equisetina* に関する課題は *E. equisetina* の多様性と、*E. equisetina* と形態が類似する *E. major* ssp. *procera* との関係である。これについても、核 ITS 領域と *trn* K 遺伝子を解析する事によって解決できると考えられた。

ITS 領域は、18S, 5.8S, 26S rRNA に挟まれたスペーサー領域 (ITS1, ITS2) であり、タンデムリピートのため解析しやすく、塩基置換速度が早いいため近縁種の分類や同定に有用である。また、雑種の検体では、両親に由来するそれぞれの DNA 配列が重なった状態で検出されるため、雑種の推定などにも有用である。*trn* K 遺伝子は *mat* K と呼ばれる ORF を含む約 2500 bp のイントロン領域で、*Ephedra* 属以外にも、*Atractylodes* 属, *Panax* 属, *Rheum* 属などの系統解析に用いられている^{28), 29), 30)}。

本章では、形態学的特徴が類似している為、種分類が不確かとなっている *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の ITS1 領域、*trn* K 遺伝子の DNA 配列を調査する事によって、*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の関係性を検討した。仮に、両分類群が同一であれば、*E. major* ssp. *procera* も麻黄の原植物となり得、資源確保の選択肢が多くなる。

第一節 実験方法

植物試料約 50 ~ 100 mg から全 DNA を抽出し、PCR (polymerase chain reaction) 法により ITS 領域及び *trn K* 遺伝子を増幅した。

塩基配列はジデオキシ法による直接塩基配列決定法によって決定した。

第二節 実験結果

1. ITS1 領域の解析結果

筆者は 2002 年から 2012 年の間に中国およびモンゴルで採集された *E. equisetina* 57 検体及び 2012 年にトルコおよびフランスで採集された *E. major* ssp. *procera* 24 検体の ITS1 領域を解析した。*E. equisetina* の ITS1 領域の全長は 1120 bp または 1121 bp, *E. major* ssp. *procera* の ITS1 領域の全長は 1121 bp であった。それらを比較した概略を Fig. 2 に示す。また、ITS1 領域の塩基配列をもとに、UPGMA によって構築された分子系統樹を Fig. 3 に示す。分子系統樹では、DDBJ に登録されている *E. equisetina* (AY394073) と、著者らが解析した *E. equisetina* が同一のグループに配置された。また、トルコ産の *E. major* ssp. *procera* と、フランス産の *E. major* ssp. *procera* も同一のグループに配置された。しかし、*E. major* ssp. *major* と *E. equisetina* および *E. major* ssp. *procera* は異なるクラスターを形成した。

E. equisetina の ITS1 領域の塩基配列を解析すると、複数の配列が重複したものが 2 タイプ確認された (Fig. 4, Fig. 5)。Fig. 4 は、塩基配列番号 770 番目の塩基から重複が始まる検体 (06c3094, 20531051) である。この配列の main peak と 2nd peak をそれぞれ比較すると、main peak は *E. intermedia* や *E. sinica* と相同性が高く、2nd peak は *E. equisetina* と相同性が高かった。Fig. 5 は塩基配列番号 808 番目の塩基から重複が開始する検体である。これらの検体は、塩基配列番号 807 番目までは DDBJ に登録されている *E. equisetina* の配列 (GU968572) 及び今回検討した *E. major* ssp. *procera* 24 検体全てと一致したが、808 番目以降の配列は 2 種類の配列の重複を認めた。Fig. 5-A の main peak は *E. equisetina* の配列 (AY394073) と相同性が高く、2nd peak は

E. equisetina の配列 (GU968572) と相同性が高かった (subtype A). 一方, Fig. 5-B の main peak は subtype A の 2nd peak と一致し, 2nd peak は subtype A の main peak と一致した (subtype B). Subtype A の main peak と 2nd peak を比較すると, 塩基配列番号 808 番目にシトシンが欠損しているためにこのような重複した配列となっていることが明白である. 今回解析した 57 検体の中で 06c3094, 20531051 を除く 55 検体全てが subtype A あるいは subtype B タイプに分類された.

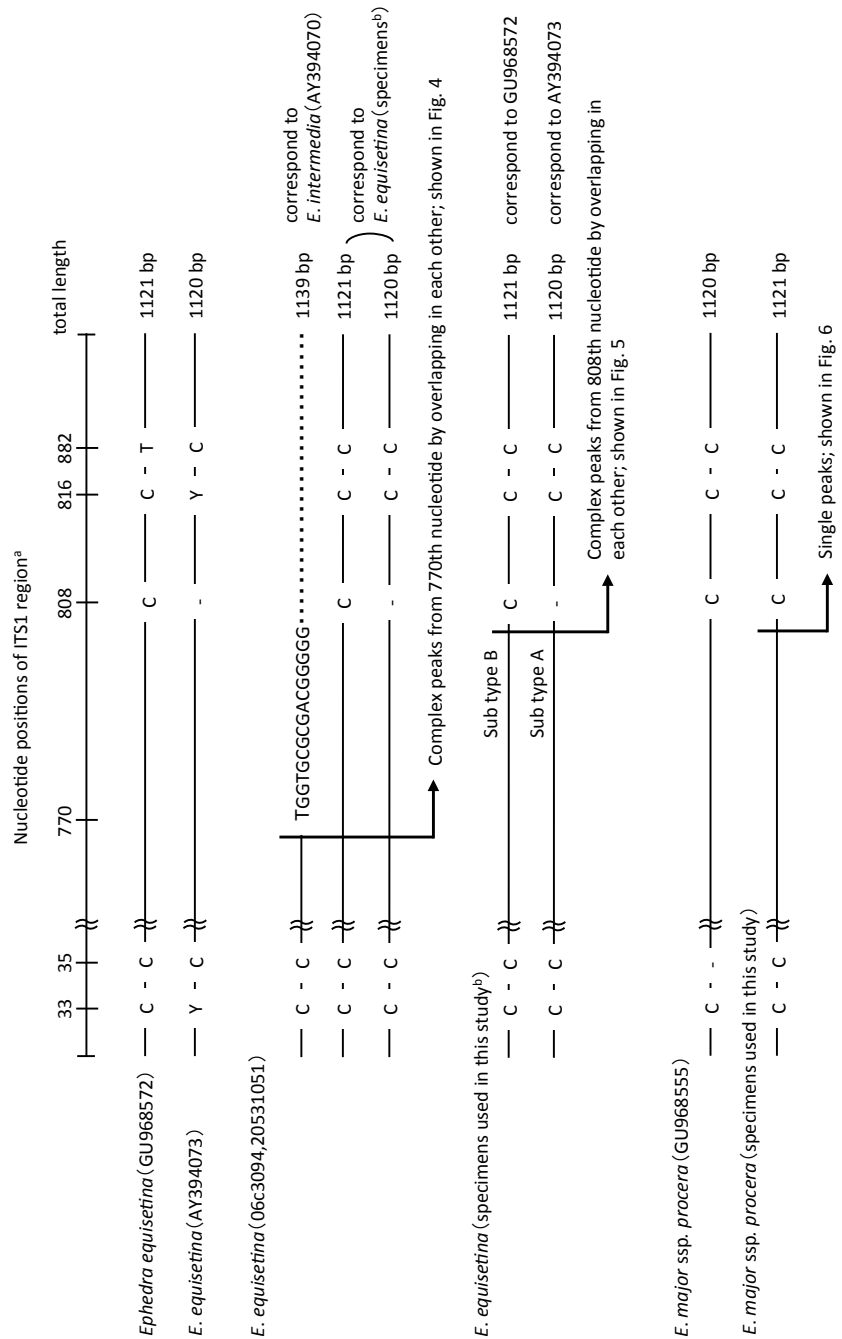
E. major ssp. *procera* の ITS1 領域の一部の配列を Fig. 6 に示した. *E. major* ssp. *procera* の ITS1 領域の塩基配列は DDBJ に登録されている *E. major* ssp. *procera* の配列 (GU968555) と 1 塩基異なっていたが, ほぼ一致した. また, 今回解析した *E. equisetina* の subtype A の main peak (subtype B の 2nd peak) とも一致した. 一方, 基準亜種である *E. major* ssp. *major* の配列 (GU968557) とは 71 または 73 塩基が異なっていた (Table 3).

以上, *E. major* ssp. *procera* と *E. equisetina* の塩基配列の違いは, シトシンの欠損に由来する 1 塩基のみであった.

今回明らかにした *E. major* ssp. *procera* の配列は, 以下の番号で DDBJ に登録された.

Accession No. LC010497, LC010498

Fig. 2 Schematic illustration of ITS1 region

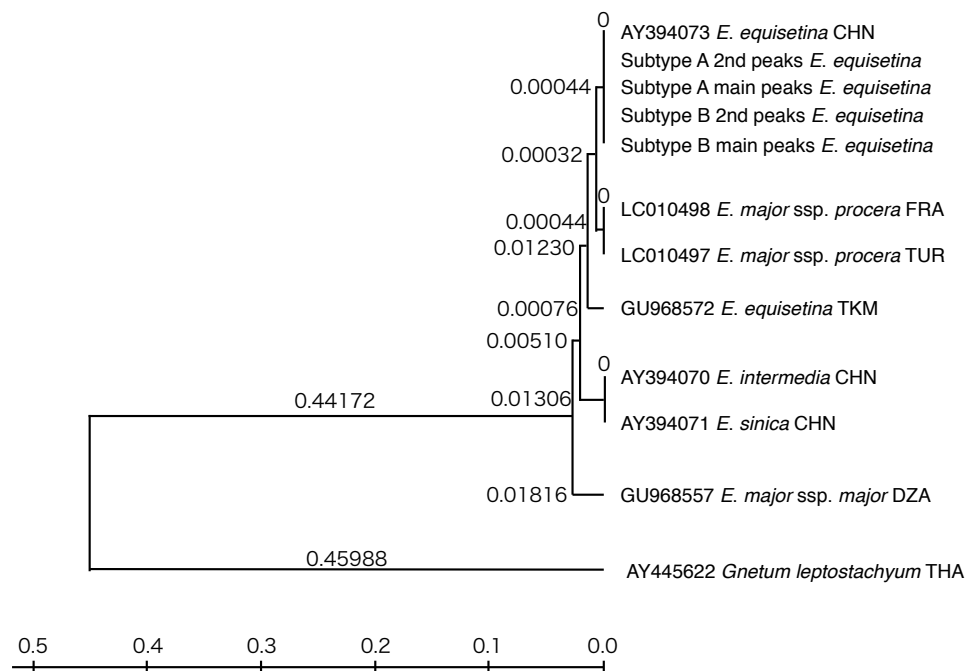


^a Nucleotide positions are counted from 5' - terminal of AY394073

^b All of the specimens except 06c3094 and 20531051

Accession No. GU968572, AY394073, AY394070 and GU968555 were registered in DDBJ

Fig. 3 The phylogenetic trees using the UPGMA method for *Ephedra* plants obtained from ITS1 sequence



The trees were outgroup-rooted using the sequence data of *Gnetum leptostachyum*. Branch lengths were calculated by Kimura's two-parameter method. Bootstrap (1000 replications) analysis was performed to estimate the confidence of topology of the consensus tree.

CHN: China FRA: France TUR: Turkey TKM: Turkmenistan DZA: Algeria
THA: Thailand

Fig.4 Example of direct sequencing Electropherogram of *E. equisetina* from China and Mongolia.

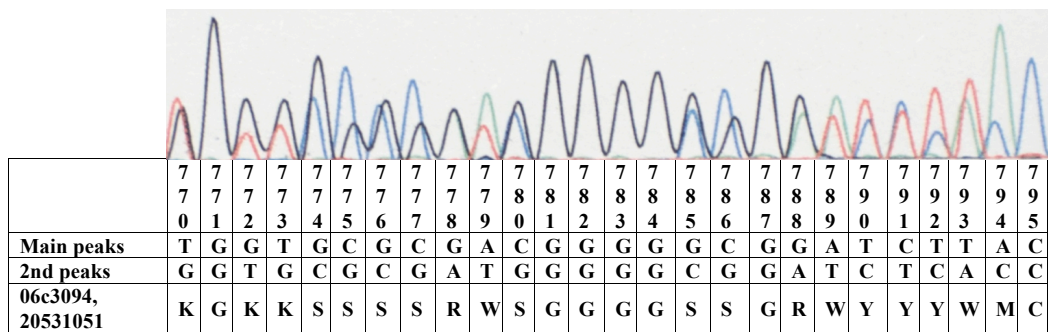


Fig.5-A Example of direct sequencing Electropherogram of *E. equisetina* from China and Mongolia.

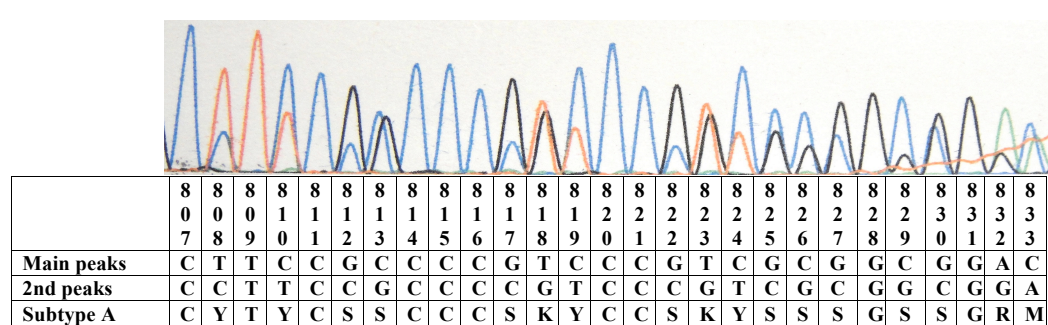


Fig.5-B Example of direct sequencing Electropherogram of *E. equisetina* from China and Mongolia.

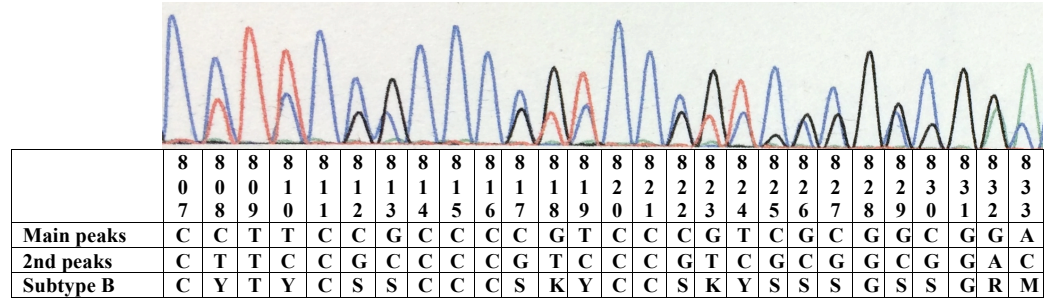


Fig. 6 Example of direct sequencing Electropherogram of *E. major* ssp. *procera* from Turkey and France.

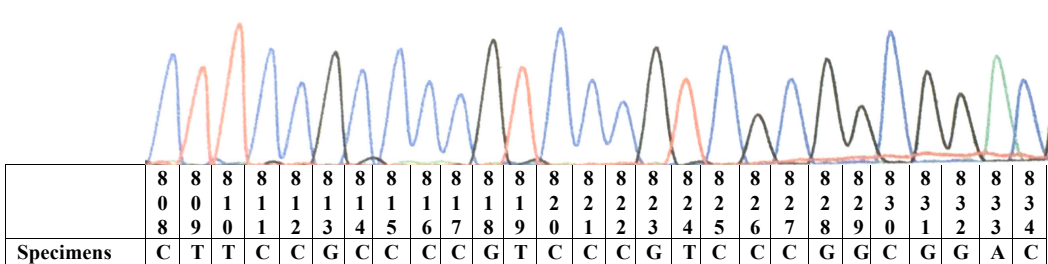


Table 3. Nucleotide differences in ITS1 region of *E. major* ssp. *procera* and *E. major* ssp. *major*

Species	Total length	Nucleotide positions ^a																						
		63	96-97	116	139	b	180	216	268	278	325	327	395	b	474	489	507	535	563	579	589	597	604	766
<i>E. major</i> ssp. <i>major</i> (GU968557, Algeria)	1098 bp	C	AA	A	T	G	T	T	C	A	A	-	T	AA	T	T	T	A	A	A	T	C	C	A
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens from Turkey)	1121 bp	T	TG	A	G	-	C	C	T	T	G	C	A	--	C	C	C	G	C	T	C	T	G	T
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens from France)	1121 bp	T	TG	R	G	-	C	C	T	T	G	C	A	--	C	C	C	G	C	T	C	T	G	T

	769	771-773	776	792	800-825	b	829	836	840	879	900	919	968	980	983	987-988	999	1079	1105	1111	DDBJ accession No.	
<i>E. major</i> ssp. <i>major</i> (GU968557, Algeria)	C	ACA	T	T	-----	C	T	T	C	-	G	T	A	T	G	AT	A	A	T	T		
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens, Turkey)	T	GTG	C	C	#	-	G	C	T	C	A	C	G	C	G	GC	T	C	C	C		
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens, France)	T	GTG	C	C	#	-	G	C	T	C	A	C	G	C	R	GC	T	C	C	C	LC010497	
																					LC010498	

#: AAT GGG GCC TTC CGC CCC GTC CCG TC

-: Deletion

^a: The number are counted for the 5' - terminal of AY394073

^b: Insertion

2. *trn K* 遺伝子の解析結果

trn K 遺伝子を解析し *E. equisetina* と *E. major ssp. procera* を比較した. *E. equisetina* の本領域の全長は 2307 bp であり, *E. major ssp. procera* の全長は 2307 又は 2316 bp であった (Table 4). *E. equisetina* の配列は DDBJ に登録されている *E. equisetina* の配列 (AB453795) と 2 塩基異なっていた. また, *E. major ssp. procera* には 2 つのジェノタイプ (M-1, M-2) が認められた. M-1 と M-2 を比較すると, 1-2 塩基の置換と塩基配列番号 186 番目から 194 番目に 9 塩基の挿入欠損が認められた. M-1 は Ankara で採集した 2 検体, Kirikkale で採集した 3 検体, M-2 は Karadiken (1 specimen), Kaiseri (6 specimens), Cappadocia (10 specimens), フランス (1 specimen) で採集された全ての検体と, U62902, U62903, U62904 を除く Kirikkale で採集された検体 (3 specimens) であった. *E. equisetina* と *E. major ssp. procera* を比較すると, M-1 との間に 10 塩基の置換が認められ, M-2 とは 11-12 塩基の置換に加え 9 塩基の挿入欠損が認められた.

今回明らかにした *E. equisetina* 及び *E. major ssp. procera* の配列は, 以下の番号で DDBJ に登録された.

Accession No. LC010493, LC010494, LC010495, LC010496

Table 4. Nucleotide differences in *trnK* intron region of *E. equisetina* and *E. major* ssp. *procera*

Species	Genotype	Total length	Nucleotide positions ^a														DDBJ accession No.
			186-194	744	796	907	1036	1160	1602	1630	1864	2014	2146	2153	2194		
<i>Ephedra equisetina</i> (AB453795, Mongolia)		2307 bp	- - - - -	A	G	C	T	A	A	C	C	G	C	T	A		
<i>E. equisetina</i> (specimens, China)		2307 bp	- - - - -	*	*	*	*	*	G	*	A	*	*	*	*		LC010496
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens, Turkey)	M-1	2307 bp	- - - - -	G	A	T	C	C	*	*	*	*	G	C	G	LC010493	
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens, Turkey)	M-2	2316 bp	TTTTC AATG	G	A	T	C	C	*	*	*	C	G	C	G	LC010494	
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens, France)	M-2	2316 bp	TTTTC AATG	G	A	T	C	C	*	A	*	C	G	C	G	LC010495	

-: Deletion *: same as top column

^a: The number are counted for the 5'-terminal of AB453795

Specimens, China: 71032, 71121, 71123, 71201, 71202, 71203, 71204, 71301, 06c3049, 06c3051, 06c3056, 06c3092, 06c3094, 06c3095, 02136, 02612-1, 02612-2, 02303-1, 02304,

02305, 02356, 02359, 90815104, 90815105, 1007224, 1007226, 1007227

Specimens, Turkey, M-1: U62902, U62903, U62904, U70101, U70102

Specimens, Turkey, M-2: U120330, U120620, U62921, U62922, U62923, U62901, U62905, U62906, U63001, U63002, U63003, U63004, U63005, U63006,

U63007, U63008, U63009, U63010

Specimens, France, M-2: U201209031

第三節 考察

1. *E. equisetina* の多様性に関して

今回検討した 57 検体の *E. equisetina* の ITS1 領域の DNA 配列は、2 タイプ確認された。一つは塩基配列番号 770 番目の塩基から重複が始まる検体であり、もう一つは 808 番目から重複が始まる検体であった。すなわち、全ての検体で異なる塩基が重複した配列が認められた。このような異なる塩基の重複した配列は別種間の交雑による可能性が推測される。例えば、770 番目から重複が始まる検体は、*E. intermedia* 又は *E. sinica* との雑種と推測される検体であり、中国新疆ウイグル自治区で 1 検体、モンゴルで 1 検体認められた。新疆ウイグル自治区には *E. sinica* が自生していないため³¹⁾、新疆ウイグル自治区の 1 検体は *E. intermedia* との雑種である可能性が高いと考えられる。

trn K 遺伝子の DNA 配列は、全ての検体で一致した。*trn K* は葉緑体遺伝子であることから、ITS1 領域の解析で雑種と推定された検体の母系は、*E. equisetina* である事が明らかになった。また、DDBJ に登録されているモンゴル産 *E. equisetina* (AB453795) と比較すると 2 塩基の変異が認められた。

2. *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* に関して

ITS1 領域の *E. major* ssp. *procera* と *E. equisetina* の DNA 配列を比較すると、*E. equisetina* の異なる塩基が重複した配列 (main peak, 2nd peak) のうち、どちらか一方の 808 番目のシトシンが欠損している事によって両種は区別が可能であった。しかし、両種の違いはこの 1 塩基のみであった。一方、*E. major* の基準亜種 *E. major* ssp. *major* (GU968557 アルジェリア産) と *E. major* ssp. *procera* を比較すると 71 または 73 塩基異なっていた。

UPGMA 系統樹では、*E. major* ssp. *procera* は著者らが解析した *E. equisetina* と DDBJ に登録されている *E. equisetina* (GU968572) の間に配置された。また、*E. major* ssp. *major* は、これらとは異なるクラスターを形成していた。すなわち、*E. major* ssp. *procera* は *E. equisetina* の多様性の範囲に含まれており、*E. major* ssp. *major* とは遠縁の関係である事が明らかになった。

以上, ITS1 領域を系統学的解析した結果, *E. major* ssp. *procera* は基準亜種の *E. major* ssp. *major* よりも *E. equisetina* と近縁関係にあることが明らかになった.

trn K 遺伝子の解析結果では *E. major* ssp. *procera* の種内に 10-11 塩基異なるジェノタイプ M-1, M-2 が認められた. M-1 は Kirikkale, Ankara 産の検体であり, M-2 は Karadiken, Kaiseri, Kirikkale, Cappadocia 産の検体であった. また, フランス産の *E. major* ssp. *procera* は M-2 に分類された. 葉緑体 DNA は母性遺伝するため, *E. major* ssp. *procera* には少なくとも 2 系統の異なる母系が存在すると考えられる. また, 葉緑体 DNA は過去に起こった種子散布を意味しており³²⁾, フランス産 *E. major* ssp. *procera* が M-2 に分類されたことから, 地理的要因を考慮すると M-2 は地中海を中心とした種子散布によるクラスターである可能性が考えられる. 形態的に *E. major* ssp. *procera* と同定される分類群には, ITS1 領域の DNA 配列は一致するが, *trn K* 遺伝子が大きく異なる, すなわち, 母系が異なる 2 系統が存在することが明らかになった.

同一種内の異なる母系の存在は過去にも報告されている. Kitani らは, 中国産 *E. intermedia* の DNA 配列を解析した結果, 18S rRNA 遺伝子は一致するが, *trn K* 遺伝子の配列に 38 塩基の挿入欠損を認めたと報告している²⁶⁾. また, *E. equisetina* にも母系由来である葉緑体 *chlB* 遺伝子に多型 (Type E1, E2) が存在することが報告されている³³⁾. このように同一種内でも母系の DNA 配列が異なっている例は多くある.

E. major ssp. *procera* のジェノタイプ M-1, M-2 と *E. equisetina* を比較すると, M-1 とは 10 塩基, M-2 とは 20-21 塩基の違いが認められた.

以上, ITS1 領域, *trn K* 遺伝子の DNA 配列を解析した結果と, 形態的な相似性と合わせると, *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* のジェノタイプ M-1, M-2 は, 種として区別し得ないと判断できる.

3. 生薬麻黄の種同定への応用について

漢方生薬の多くは植物を由来とし、JP16 によって各生薬に対応した原植物が定められている。そのため、正しい植物が使用されているか否かを鑑別する必要があるが、漢方生薬は粉末化したものや、刻んだものを使用する 경우가多く、鑑別することは非常に困難である。近年、生薬鑑別に分子生物学的手法が取り入れられるようになり、DNA 配列を指標とする鑑別方法の報告が増えてきている。例えば、Masada-Atsumi ら³⁴⁾は、Amplification Refractory Mutation System (ARMS) 法を用いた *trn* L/F 領域における升麻 (CIMICIFUGAE RHIZOMA) の鑑別法を報告しており、Kitaoka ら³⁵⁾は、Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) 法を用いた ITS 領域における木通 (AKEBIAE CAULIS) の鑑別法を報告している。また、Murata ら³⁶⁾は、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法を用いた当帰 (ANGELICAE RADIX) の鑑別法を報告している。これまで JP16 収載種である *E. equisetina* は、JP16 収載種ではない *E. monosperma* や *E. gerardiana* などと ITS 領域の塩基配列の相同性が高いため区別が困難とされており問題となっていた³⁷⁾。しかし、今回明らかにした *E. equisetina* の配列は、シトシンの挿入欠損に由来した重複を含む配列であるため、Direct sequence 法によって *E. monosperma* や *E. gerardiana* と明らかに区別可能であった。また、*E. major* ssp. *procera* も同様に *E. monosperma* や *E. gerardiana* と区別が困難であったが、*trn* K 遺伝子の配列を利用する事で区別可能であった。以上、本研究で検討した ITS1 領域の DNA 配列は *E. equisetina* の同定に、*trn* K 遺伝子は *E. major* ssp. *procera* の同定に利用可能である。

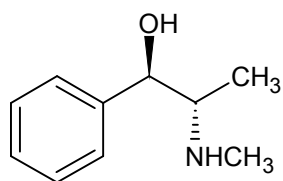
第二章 *E. equisetina* 及び *E. major ssp. procera* のアルカロイド分析

緒言

第一章において *E. equisetina* と *E. major ssp. procera* は種として区別し得ない事を明らかにした。このことは、分類学的に *E. major ssp. procera* の地上茎に由来する生薬を麻黄として使用しても問題ない事を示しているが、含有成分に関しては不明である。その為、*E. major ssp. procera* に由来する生薬について、JP16 麻黄規格への適否を調べるためにアルカロイド含量を測定する必要がある。

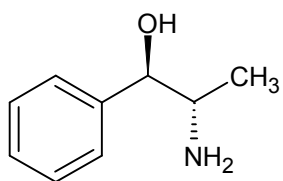
漢方生薬麻黄は日本および中国において葛根湯、麻黄湯、小青竜湯などに使用される生薬である。JP16 には *Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A. Meyer, *E. equisetina* Bunge の 3 種が収載され、総アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）0.7%以上を含むと規定されている⁷⁾。また、2010 年版中華人民共和国薬典では同様に 3 種が収載され、総アルカロイド（エフェドリン塩酸塩及びプソイドエフェドリン塩酸塩に換算して）0.8%以上を含むと規定されている³⁸⁾。このように日本および中国では、生薬麻黄を使用する場合に、定められた種を使用するだけでなく、成分含量の規定を満たさなければならない。JP16 に収載されている 3 種の中では、*E. equisetina*, *E. intermedia*, *E. sinica* の順に総アルカロイド含量が高いとされている^{18), 39)}。また、麻黄はエフェドリンおよびプソイドエフェドリン以外にノルエフェドリン、ノルプソイドエフェドリン、メチルエフェドリンなどのアルカロイドを含有している (Fig. 7)。Hong らは 5 種類のエフェドリン系アルカロイドに対するエフェドリンおよびプソイドエフェドリンの比率によって JP16 収載 3 種を区別できると報告している¹⁸⁾。

Fig. 7 The chemical structures of ephedrine alkaloids



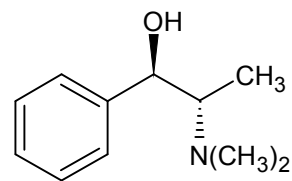
(1*R*,2*S*)-Ephedrine

(E)



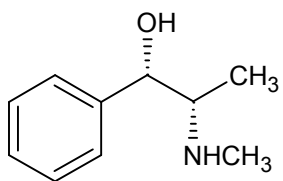
(1*R*,2*S*)-Norephedrine

(NE)



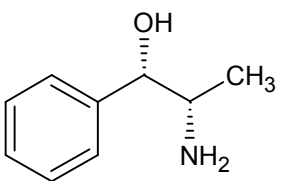
(1*R*,2*S*)-*N*-Methylephedrine

(ME)



(1*S*,2*S*)-Pseudoephedrine

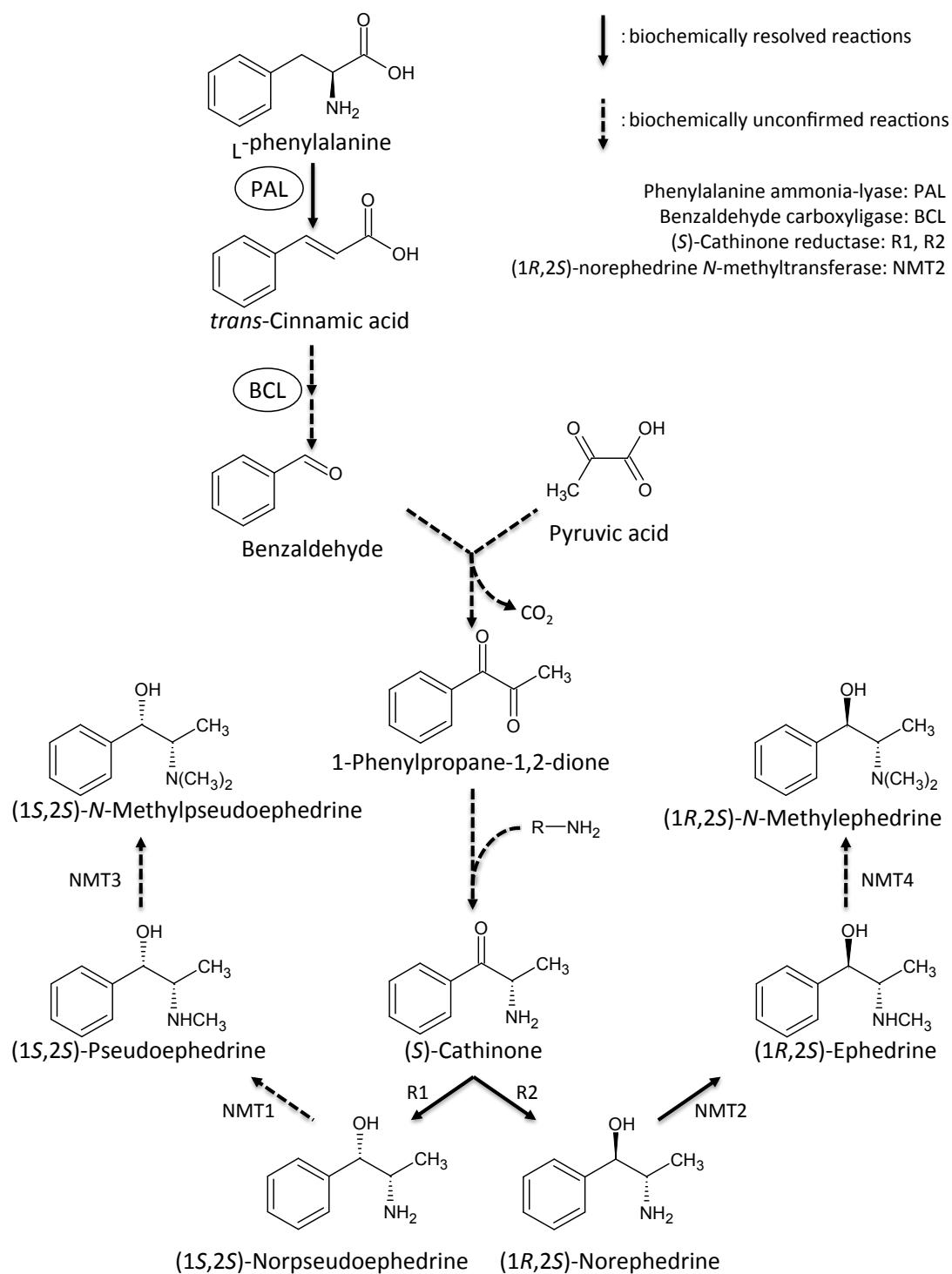
(PE)



(1*S*,2*S*)-Norpseudoephedrine

(NPE)

Fig. 8 The proposed biosynthetic pathway to ephedrine alkaloids in *E. sinica* ³⁴⁾



エフェドリンおよびプソイドエフェドリンは、フェニルアラニンから Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) によって生成された *trans*-Cinnamic acid を前駆体として生合成されると提案されている (Fig. 8)⁴⁰⁾。また、前駆体である 1-Phenylpropane-1,2-dione および (*S*)-Cathinone は、成熟した地上茎からは検出されず、若い地上茎からは検出されると報告されている⁴¹⁾。(*S*)-Cathinone は還元された後、*N*-メチル化を経てエフェドリン系アルカロイドが生合成される。一方、*Ephedra* 属植物の中には、このようなアルカロイドを含有しないものも知られており⁴²⁾、含量に関しても種間差があると考えられる。そこで、本論文第二章で使用した *E. equisetina* 及び *E. major* ssp. *procera* (U20120929-1 を除く) を用いて、エフェドリン系アルカロイドの組成に関する種、産地ごとの特徴を精査するとともに、定量を行う事によって、*E. major* ssp. *procera* が、含有成分的に JP16 を満たすか否かを検討した。

第一節 実験方法

植物標本から草質茎を採取し、乾燥後粉末にした。移動相で抽出した後メンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過し、試料溶液を調製した。

HPLC 法により、エフェドリン (E)、プソイドエフェドリン (PE)、ノルエフェドリン (NE)、ノルプソイドエフェドリン (NPE)、メチルエフェドリン (ME) の含量をピーク面積から絶対検量線法で定量した。

第二節 実験結果

中国及びモンゴルの 6 地点で採集された 57 検体の *E. equisetina* のエフェドリン系アルカロイドの分析結果を Fig. 9, Fig. 11 に示す. *E. equisetina* の総アルカロイド含量 (E+PE) は 1.72%であり, JP16 によって定められている麻黄の総アルカロイド含量の規定値 (0.7%) の 2 倍以上に相当した. また, 6 地点で採集された全ての検体において JP16 の規定を満たした (Fig. 11). 最も総アルカロイド含量が高かったのは, 青海省産で 2.64%であった. 次に, エフェドリン系アルカロイド 5 種類の組成を Fig. 13 に示す. E 及び PE に着目すると, 新疆ウイグル自治区産の *E. equisetina* では, E : 64%, PE : 20%, 河北省産では, E : 64%, PE : 22%, 青海省産では, E : 13%, PE : 80%, 甘肅省産では, E : 12%, PE : 73%, 内蒙古自治区産では, E : 7%, PE : 84%, モンゴル産では, E : 9%, PE : 82%であった.

トルコの 5 地域で採集した 23 検体の *E. major ssp. procera* のアルカロイドの分析結果を Fig. 10, Fig. 12 に示す. *E. major ssp. procera* の総アルカロイド含量 (E+PE) は 0.70%であった. これは JP16 の規定値を満たしている. 最もアルカロイド含量が高かったのは, Ankara 産で, 1.17 %であった. 次にアルカロイド組成比を Fig. 14 に示す. E 及び PE に着目すると, Karadiken 産の検体では, E : 0%, PE : 93%, Kaiseri 産では, E : 25%, PE : 65%, Kirikkale 産では, E : 0%, PE : 97%, Cappadocia 産では, E : 31%, PE : 62%, Ankara 産では, E : 1%, PE : 95%であった. Karadiken, Kirikkale 産ではエフェドリンが検出されず, Ankara では 1 検体がわずかに検出されたのみであった.

Fig. 9 Ephedrine alkaloid contents of *E. equisetina* from China and Mongolia

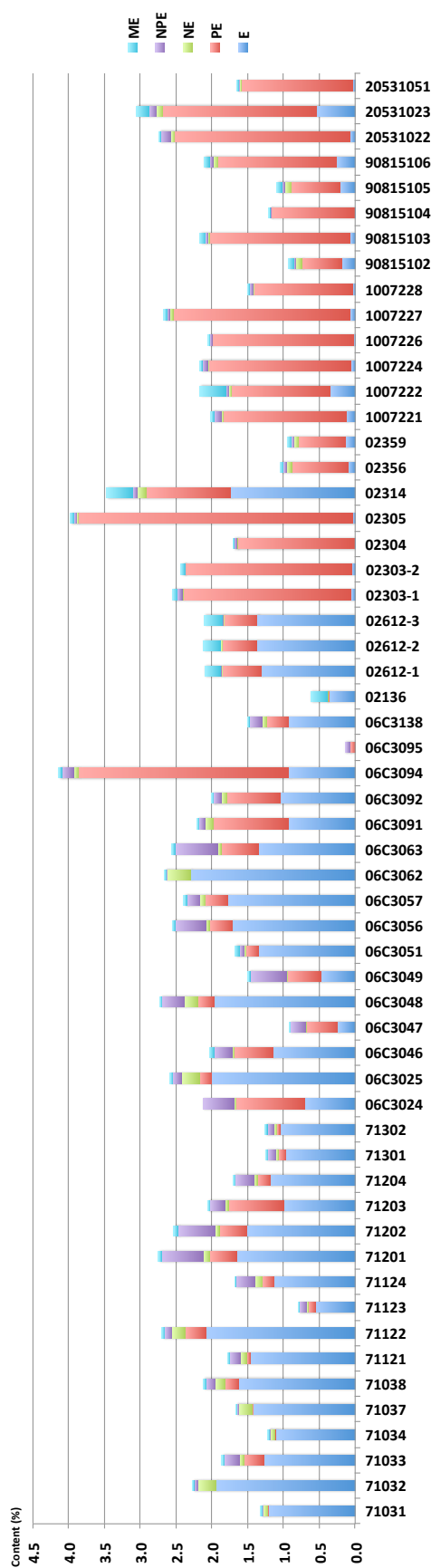


Fig. 10 Ephedrine alkaloid contents of *E. major* ssp. *procera* from Turkey

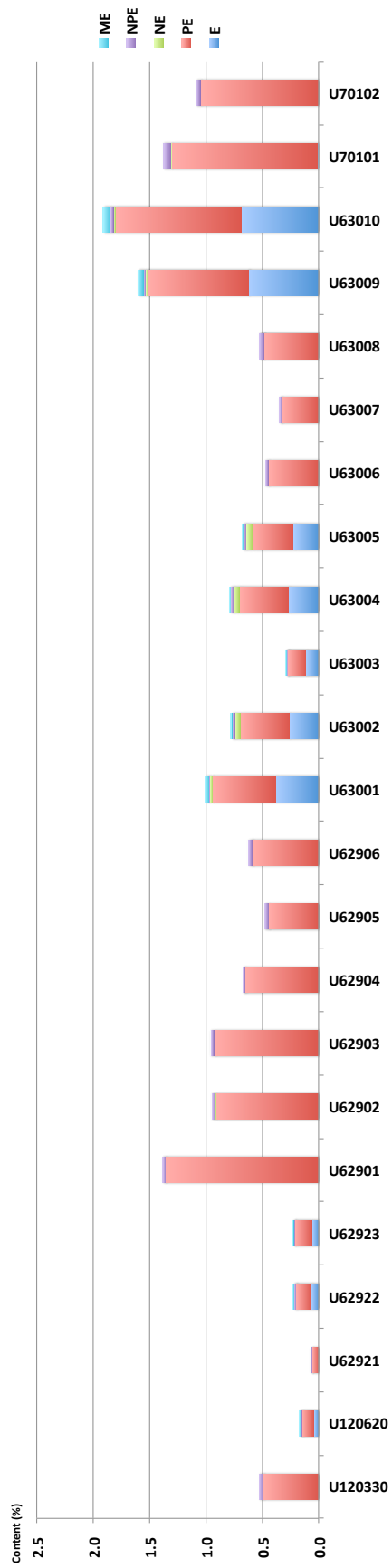


Fig. 11 Ephedrine and pseudoephedrine contents of *E. equisetina* from China and Mongolia

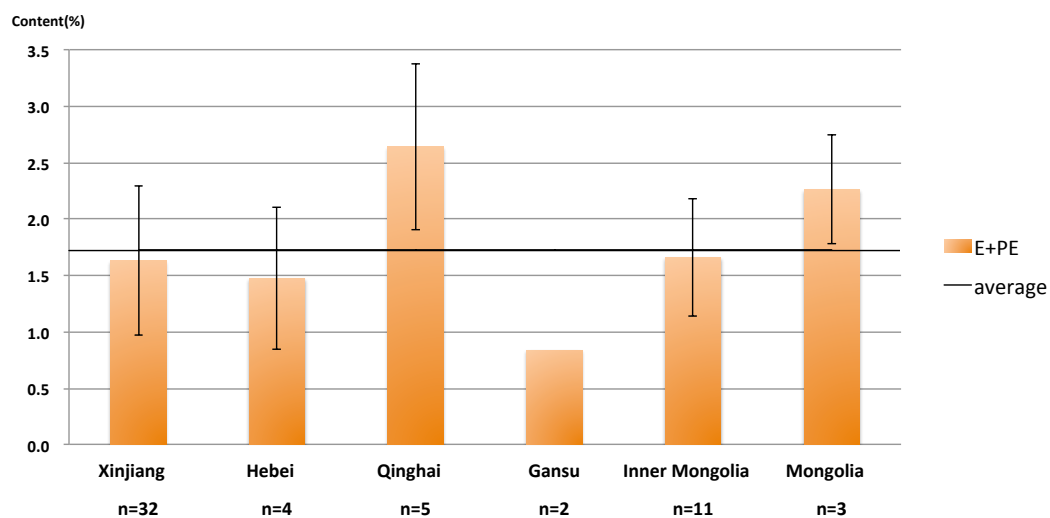


Fig. 12 Ephedrine and pseudoephedrine contents of *E. major* ssp. *procera* from Turkey

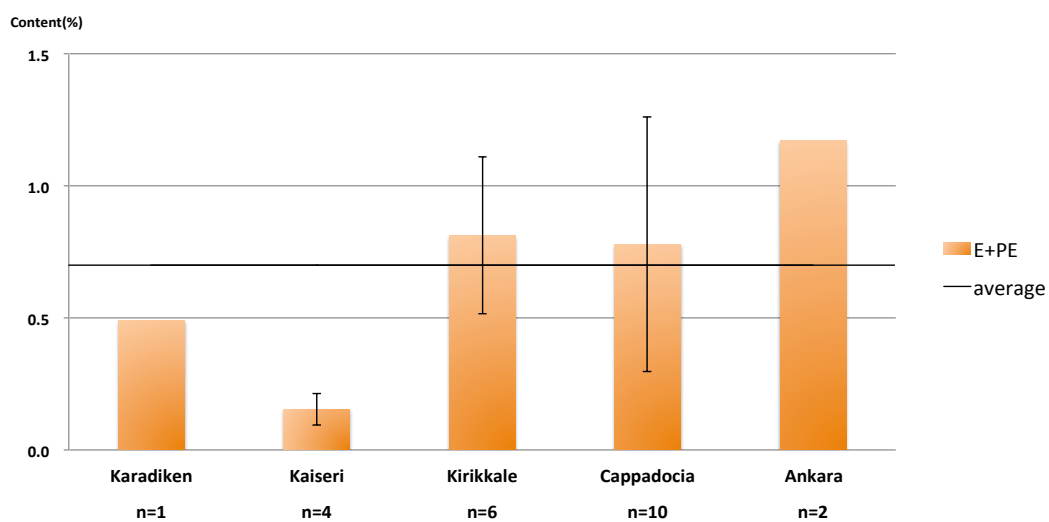


Fig. 13 Ratio of five constituents of *E. equisetina*; Ephedrine (E), Pseudoephedrine (PE), Norephedrine (NE), Norpseudoephedrine (NPE) and Methylephedrine (ME)

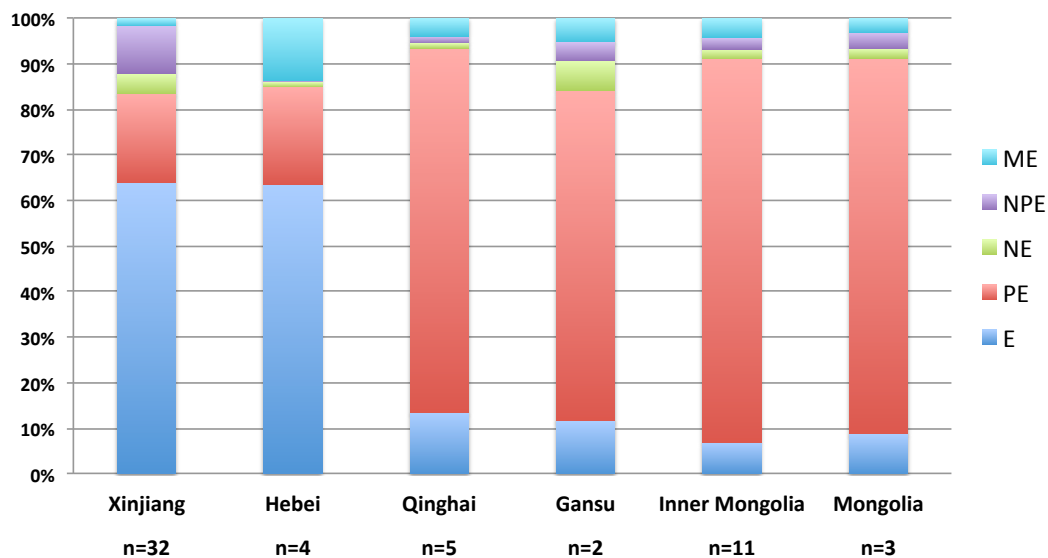
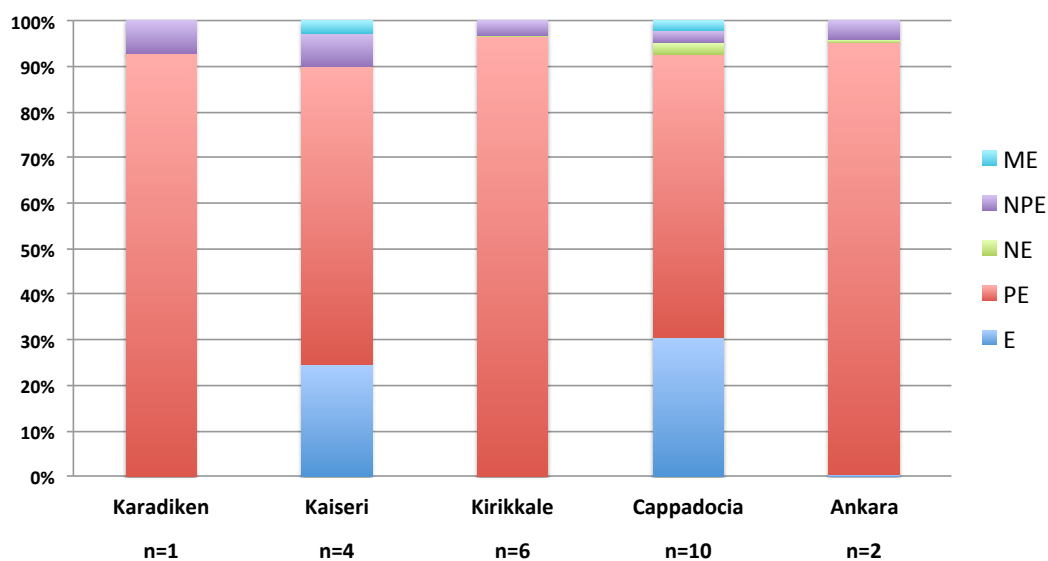


Fig. 14 Ratio of five constituents of *E. major ssp. procera*; Ephedrine (E), Pseudoephedrine (PE), Norephedrine (NE), Norpseudoephedrine (NPE) and Methylephedrine (ME)



第三節 考察

麻黄の含有成分において, *E. equisetina* と *E. major ssp. procera* の草質茎(乾燥)は JP16 が規定する総アルカロイド含量 0.7 %を満たしていた. *E. equisetina* は JP16 収載種であり, *E. major ssp. procera* はトルコで地上茎をリウマチの疼痛に, 毬果を頭痛に使用されている^{20), 21)}. *E. major ssp. procera* の総アルカロイド含量は JP16 の基準を満たしている為, 含有成分的に生薬麻黄として使用可能である.

アルカロイド組成では, 産地ごとに特徴が認められた. *E. equisetina* では新疆ウイグル自治区, 河北省の検体では 5 種類のアルカロイドの総和に対するエフェドリンの比率が 64%であるのに対して, 青海省, 甘肅省, 内蒙古自治区, モンゴルでは 7~13%であった. Hong らは, アルカロイド組成によって *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* の 3 種を区別できると報告しているが¹⁸⁾, 本研究での *E. equisetina* のエフェドリンの比率は, 産地によって異なる結果となった. Hong らが使用した *E. equisetina* は, 新疆ウイグル自治区で採集したもののみであり, エフェドリンの比率が 43%以上であると報告している. 本研究での新疆ウイグル自治区産の *E. equisetina* のエフェドリン比率は 64%であり, Hong らの結果と同様の傾向を示した. 一方, *E. major ssp. procera* では Kaiseri, Cappadocia の検体では, 25~31%であるのに対して, Karadiken, Kirikkale, Ankara の検体では 0~1%であった. このように, 両分類群は生育地によって含有するアルカロイドの比率が大きく異なることが明らかになった. その為, アルカロイドの組成から, 両分類群は区別できない事となる. アルカロイドの組成は遺伝的に支配されているため⁴³⁾, *E. equisetina* 及び *E. major ssp. procera* は異なる遺伝背景を持った個体が各地域にクラスターを形成しているものと考えられる. なお, 第一章で明らかになったジェノタイプとアルカロイドには相関は認められなかった.

以上, アルカロイドの分析結果から, 両分類群は区別できないことを支持する結果が得られた.

総論

本研究では、今後入手が困難になると予想される生薬麻黄の多方面にわたる供給地を確保することを目指し、*E. equisetina* と形態が類似する *E. major* ssp. *procera* の利用を検討した。

麻黄の原植物の一種である *E. equisetina* は、形態的な多様性が大きいことから *E. major* ssp. *procera* が *E. equisetina* の多様性の範囲に含まれることを予想した。この仮説は、DNA 配列の解析、含有成分の分析結果によって支持され、分子生物学的、含有成分的に *E. major* ssp. *procera* が *E. equisetina* の多様性の範囲に含まれること証明した。

1. *E. equisetina* の多様性

E. equisetina は、中国の中で東西に広く分布しており、形態に変化の多い種である。本研究で使用した検体は、2500 km 以上離れた（河北省と新疆ウイグル自治区）ものを含む。また、形態的にも毬果が赤色の検体や、黄色の検体がある。外部形態によって同定されたこれらの植物検体を用いて、DNA 解析を行った。ITS1 領域の解析結果から、2 つのタイプに分類できた。1 つは *E. intermedia* の配列が重複した雑種と推定される検体、もう 1 つは 808 番目にシトシンが 1 塩基挿入欠損した配列が重複した検体である。808 番目から重複が始まる検体は産地、外部形態に依存せず認められた。仮に、808 番目から重複が始まる検体も雑種であるならば、*E. equisetina* の形態に変化が多い理由として説明できる。

2. *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の関係性

trn K 遺伝子の解析結果では、*E. major* ssp. *procera* の種内に 2 つのジェノタイプ (M-1, M-2) が認められた。ジェノタイプ M-1, M-2 は外部形態によって区別されず、ITS1 領域の DNA 配列によっても区別できなかった。すなわち、ジェノタイプ M-1, M-2 は母系が異なっているが、同一種として扱っても問題ないと考えられる。また、*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の間には 10 塩基または、20-21 塩基の変異が認められるが、ITS1 領域の解析結果では、

E. equisetina と *E. major* ssp. *procera* の違いは 1 塩基であり, *E. major* ssp. *procera* と *E. major* ssp. *major* の違いより小さかった. ITS1 領域の DNA 配列をもとに UPGMA 系統樹を構築すると, *E. major* ssp. *procera* は *E. equisetina* の多様性の範囲に含まれている事が明らかになった. 形態学的にも両分類群を区別する明確な違いは認められないことから, *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* は母系は異なっているが, 種としては区別されず, シノニムである可能性が示唆された. その為, *E. major* ssp. *procera* を生薬麻黄の原植物として扱っても問題ないと考えられる.

3. *E. major* ssp. *procera* の麻黄としての使用

E. equisetina と *E. major* ssp. *procera* のエフェドリン系アルカロイドを分析した結果, 両分類群は JP16 が規定する 0.7 %以上の総アルカロイドを含有していた. また, *E. major* ssp. *procera* は産地によって全く異なるアルカロイド組成を示し, *E. equisetina* と共通していた. 更に, *E. major* ssp. *procera* は, トルコでの薬用植物としての使用経験もあることから, 生薬麻黄の原植物として扱っても問題ないと考えられる.

4. DNA 鑑別

今回明らかにした *E. equisetina* の ITS1 領域の DNA 配列および, *E. major* ssp. *procera* の *trn* K 遺伝子の DNA 配列は種に特異的であったため, Direct sequence 法を用いた生薬鑑別に利用可能であった. また, これらの DNA 配列情報をもとに, ARMS 法などのより簡便な鑑別法への応用が期待される.

以上, 本研究により *E. equisetina* 及び近縁植物の種分類と多様性を解明した. これにより, *E. major* ssp. *procera* の多様性は *E. equisetina* の種内における多様性に含まれることが明らかになった. すなわち, *E. major* ssp. *procera* は *E. equisetina* のシノニムであり, 本分類群に由来する生薬も生薬麻黄として利用できる事を示した. 本研究ではトルコ, フランス産の *E. major* ssp. *procera* の解析を行ったが, 他の地域の *E. major* ssp. *procera* を解析する事によって, 幅広い供給地の確保が期待され, 麻黄の安定供給につながると考えられる.

実験の部

使用機器

- ・ ヒートブロック恒温槽：major science, EL-01
- ・ ヒートブロック恒温槽：日伸理化, ND-S01
- ・ 冷却遠心分離器：eppendorf, 5415R, 5417R
- ・ 分光光度計：GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社, Gene Quant
- ・ サーマルサイクラー：ASTEC, PC-320
- ・ サーマルサイクラー：タカラバイオ株式会社, TP600
- ・ サーマルサイクラー：BIONEER, MyGenie32
- ・ 電気泳動：ADVANCE, Mupid-2plus
- ・ トランスイルミネーター：フナコシ, NTM-10
- ・ シーケンサー：Applied Biosystems, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
- ・ アライメントソフト：株式会社日立ソリューションズ, DNASIS version 3.0

software

- ・ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

検出器：株式会社日立ハイテクノロジーズ, L-2400

ポンプ：株式会社日立ハイテクノロジーズ, L-2130

オートサンプラー：株式会社日立ハイテクノロジーズ, L-2200

カラム：和光純薬工業, Handy ODS (4.6 mm×250 mm)

使用試薬

DNeasy Plant Mini Kit : QIAGEN

KOD-Plus-Neo : TOYOBO

QIA quick PCR Purification Kit : QIAGEN

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit : Applied Biosystems

GelRed : Biotium Inc.

- ・ アガロース（細菌培地用）：和光純薬工業
- ・ Sodium Lauryl Sulfate（生化学研究用特製）：ナカライテスク（株）
- ・ プライマー：理科研株式会社
- ・ アセトニトリル（高速液体クロマトグラフィー用）：関東化学（株）
- ・ リン酸（特級）：ナカライテスク（株）
- ・ エフェドリン塩酸塩：和光純薬工業
- ・ ノルエフェドリン塩酸塩：和光純薬工業
- ・ プソイドエフェドリン塩酸塩：和光純薬工業
- ・ メチルエフェドリン塩酸塩：和光純薬工業
- ・ ノルプソイドエフェドリン塩酸塩：ノルエフェドリンより合成

第二章 DNA 解析

乾燥した植物標本から地上茎 50-100 mg を取り、液体窒素下で粉碎した。DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、同キットのプロトコールに従い全 DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として ITS1 領域及び *trnK* 遺伝子の増幅を PCR 法により行った。

反応溶液は、10 × PCR buffer for KOD-Plus-Neo 2.5 μL, dNTP 0.2 mM 2.5 μL, MgSO₄ 1.0 mM 1.0 μL, forward primer 0.4 mM 0.5 μL, reverse primer 0.4 mM 0.5 μL, 全 DNA 100-120 ng, 0.5 units of KOD-Plus DNA polymerase (TOYOBO) 0.5 μL, H₂O で全量 25 μL とした。使用したプライマーおよび PCR プログラムは以下に示した。

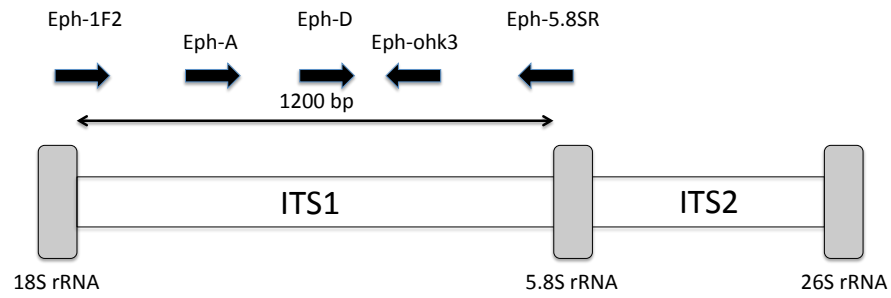
3 μL の PCR 産物を 1.5 % のアガロースゲルを用いて電気泳動し、ITS1 領域及び *trnK* 遺伝子の増幅を確認した後、QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて PCR 産物を精製した。

精製した PCR 産物は BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて反応を行った。使用したプライマーおよび sequencing プログラムは以下に示した。反応産物を精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析を行った。DNA 配列は DNASIS version 3.0 software (Hitachi) を用いて解析した。混合塩基が認められた場合は、得られたエレクトロフェログラムを目視によって確認した。

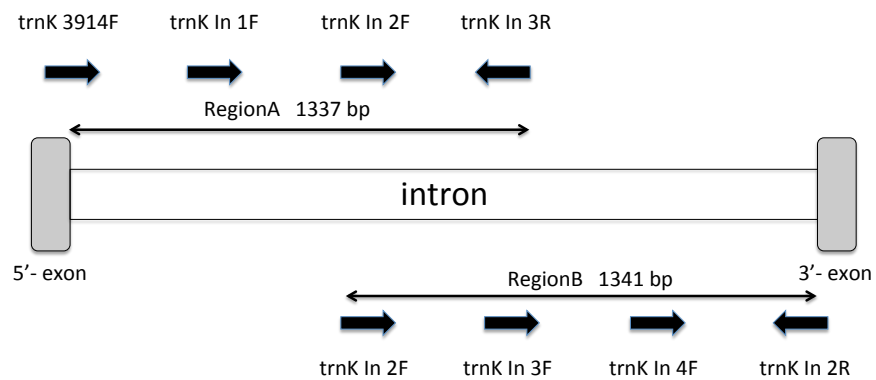
得られた ITS1 領域の DNA 配列を用いて分子系統樹を構築した。UPGMA 系統樹には PAUP (Version 4.0 β 4a, Sinauer Assoc. Inc. U.S.A.) を用いて構築し、枝長は Kimura's two-parameter 法を用いて算出した。トポロジーの信頼性は 1000 回のブートストラップによって検定した。

プライマーの結合位置

ITS1 領域



trn K 遺伝子



ITS 1 領域

Primer

Eph-1F2	5'- ACG TCG CGA GAA GTT CAT TG -3'
Eph-5.8SR	5'- CGG GAT TCT GCA ATT CAC AC -3'
Eph-A	5'- GCG GGG ACG TGG ACG GTC TT -3'
Eph-D	5'- CCC TTC CCC GTG TAA CAC GC -3'
Eph-ohk3	5'- GAA AGG AAA TAG CGC CGG TC -3'

ITS1 PCR program

Hot start 94°C 2 min

Number cycles 30

Denaturation 94°C 15 sec

Annealing 55°C 30 sec

Extension 68°C 45 sec

Final extension 68°C 5 min

Cycle sequencing program

Hot start 96°C 2 min

Number cycles 25

96°C 10 sec

50°C 5 sec

60°C 4 min

trn K 遺伝子

Primer

trnK 3914F	5'- TGG GTT GCT AAC TCA ATG G -3'
trnK In 3R	5'- CTT TAG CAA TCT TAT CGT GTC TTT -3'
trnK In 1F	5'- ATG ACG ATT GAG ATT CTT TC -3'
trnK In 2F	5'- AAT TTT CAA TCA GTC TTT TCT CTA -3'
trnK In 3F	5'- ATT GAT TTT GCT GGG AAC TAC TAT -3'
trnK In 4F	5'- GCA TGG CTT AGT TTT ACC GAC AAT -3'
trnK In 2R	5'- ACG TTT ATT TAT TGC TTC ACT GTA -3'

trn K regionA PCR program

Hot start 94°C 2 min
Number cycles 35
Denaturation 94°C 15 sec
Annealing 56°C 30 sec
Extension 68°C 45 sec
Final extension 68°C 5 min

trn K region B PCR program

Hot start 94°C 2 min
Number cycles 35
Denaturation 94°C 15 sec
Annealing 54°C 30 sec
Extension 68°C 45 sec
Final extension 68°C 5 min

Cycle sequencing program

Hot start 96°C 2 min
Number cycles 25
96°C 10 sec
50°C 5 sec
60°C 4 min

第三章, 第四章アルカロイドの定量

HPLC 法によってエフェドリン (E), プソイドエフェドリン (PE), ノルエフェドリン (NE), ノルプソイドエフェドリン (NPE), メチルエフェドリン (ME) の含量を測定した. 試料調製および HPLC 分析条件は以下に示した.

JP16 定量法との同等性

以下の定量法は JP16 の定量法と比較して 5%以下の誤差である事を確認している.

植物標本から採取した草質茎を粉碎し, 得られた粉末を 105°C で 15 時間乾燥させた. 粉末 100 mg を正確に量りとり移動相を 5.0 mL 加えて室温で 20 分間放置した. 25 分間超音波抽出した後, 3000 rpm, 15 分遠心した. 上澄み液を 0.45 μ m フィルターで濾過したものを試料溶液とした.

HPLC 測定条件

カラム : Wakopak Handy ODS column (4.6 mm I.D. 250 mm)

カラム温度 : 室温

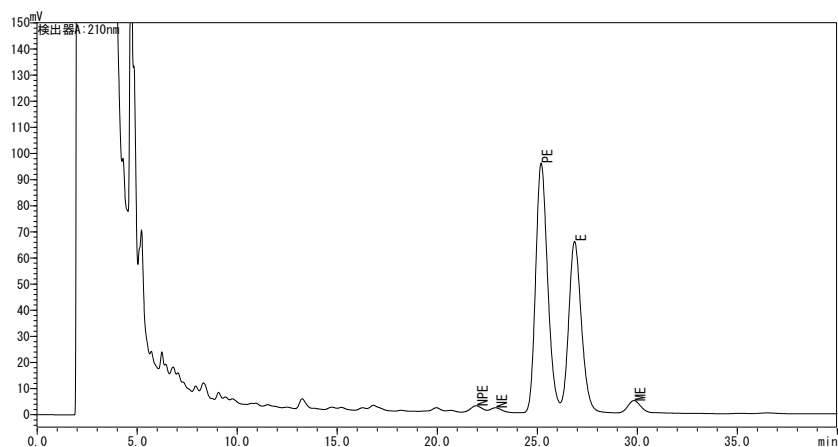
流速 : 1.0 mL / min

検出波長 : 210 nm

移動相 : CH₃CN / H₂O / H₃PO₄ / SDS-Na (195 mL / 305 mL / 0.8 mL / 2.4 g)

注入量 : 10 μ L

標本番号 U63009



引用文献

- 1) Price R. A., Systematics of the Gnetales: A review of morphological and molecular evidence. *Int. J. Pl. Sci.*, **157**: S40-S49, (1996).
- 2) Fu L. G., Yu Y. F. and Riedl H., *Ephedra equisetina* Bunge In: Flora of China volume 4: P.100. Science Press, Beijing & St Louis, Missouri Botanical Garden, (1999).
- 3) Ni S., Matsumoto M., Shimoyama Y., Allain N., Coskun M., Yilmaz T. and Mikage M., Anatomical, chemical, and molecular genetic studies of *Ephedra distachya* L.. *J. Jpn. Bot.*, **88** (3): 144-155, (2013).
- 4) Kakiuchi N., Mikage M., Ickert-Bond S., Maier-Stolte M. and Freitag H., A molecular phylogenetic study of the *Ephedra distachya* / *E. sinica* complex in Eurasia. *Willdenowia*, **41** (2): 203-215, (2011).
- 5) Rydin C., Khodabandeh A. and Endress P. K., The female reproductive unit of *Ephedra* (Gnetales): comparative morphology and evolutionary perspectives. *Bot. J. Linn. Soc.*, **163**: 387-430, (2010).
- 6) Cheng C. Y., *Ephedra equisetina* Bunge. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae tomus 7: 478, Science Press, Beijing, (1978) (in Chinese).
- 7) Society of Japanese Pharmacopoeia, The Japanese Pharmacopoeia, 16th edn. Yakuji Nippo, Tokyo: P.1589, (2011).
- 8) 生薬委員会, 原料生薬使用量等調査報告書 (2) -平成 21 年度および 22 年度の使用量-, 日本漢方生薬製剤協会, 東京:2, (2013).
- 9) 日本貿易振興機構, <http://www.jetro.go.jp/world/asia/cn/trade_02/>, (参照 2015.1.13).
- 10) 厚生労働省, 薬事工業生産動態統計年報
<<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/105-1c.html>>, (参照 2015.1.13).
- 11) 農林水産省, <http://www.maff.go.jp/j/keikaku/pdf/yakuyou_sesaku1.pdf>, (参照 2015.1.13).
- 12) 農林水産省, 平成 26 年度農林水産予算概算決定の概要,
<http://www.maff.go.jp/j/budget/2014/pdf/31_26_kettei.pdf>, (参照 2015.1.13).
- 13) 御影雅幸, 能登半島における国産麻黄生産拠点の構築, 厚生労働科学研究

費補助金（創薬基盤推進研究事業）。

- 14) 白瀧義明, 第 28 回生薬に関する懇談会講演要旨集テーマ『麻黄』, 日本生薬学会関東支部・社団法人東京生薬協会, (2012).
- 15) 田中俊弘, 大場幸次, 川原一仁, 酒井英二, 市場品麻黄各種の成分組成の比較エフェドリンアルカロイドについて, *Nat. Med.*, **49**(4): 418-424, (1995).
- 16) 木島正夫, 麻黄の生薬学的研究（第五報）華北, 蒙疆, 満洲産各種麻黄の考察, 薬学雑誌, 乙号 **65**: 497-502, (1945).
- 17) Zhang J.S., Tian Z., and Lou Z.C., Quality evaluation of twelve species of Chinese Ephedra (mahuang). *Acta Pharm. Sin.*, **24**(11): 865-871, (1989).
- 18) Hong H., Chen H. B., Yang D. H., Shang M. Y., Wang X., Cai S. Q., Mikage M., Comparison of contents of five ephedrine alkaloids in three official origins of Ephedra Herb in China by high-performance liquid chromatography. *J. Nat. Med.*, **65**: 623-628, (2011).
- 19) Flora of Pakistan volume **186**
<http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=242426752>, (参照 2015.1.13).
- 20) Gokturk A., Olmez Z., Temel F., Some native plants for erosion control efforts in Coruh river valley, Artvin, Turkey. *Pak. J. Biol. Sci.*, **9** (4): 667-673, (2006).
- 21) Fakir H., Korkmaz M. and Guller B., Medicinal plant diversity of Western Mediterranean region in Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences*, **3** (2): 3-4, (2009).
- 22) Altundag E. and Ozturk M., Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc Behav Sci*, **19**: 756-777, (2011).
- 23) Freitag H. and Maier-Stolte M., *Ephedraceae*. In T. G. Tutin (ed.), *Flora Europaea*, 2nd ed., vol. **1**. Cambridge University Press, London, UK, (2007).
- 24) Kondo N. Mikage M. and Ikeda K., Medico-botanical studies of *Ephedra* plants from the Himalayan region, part III causative factors of variation of alkaloid content in herbal stems¹⁾. *Nat. Med.*, **53**(4): 194-200, (1999).

- 25) Zhu S., Kitani Y and Komatsu K., Exploration of *Ephedra* resource in Mongolia: from field investigation to molecular identification and chemical evaluation. *J. Trad. Med.*, **29**: 35-40, (2012).
- 26) Kitani Y., Zhu S., Omote T., Tanaka K., Batkhuu J., Sanchir C., Fushimi H., Mikage M., Komatsu K., Molecular analysis and chemical evaluation of *Ephedra* plants in Mongolia. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**(7): 1235-1243, (2009).
- 27) Long C. Kakiuchi N. Takahashi A. Komatsu K. Cai S. and Mikage M., Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* Plants in China. *Planta Med*, **70**(11): 1080-1084, (2004).
- 28) Mizukami H., Shimizu R., Kohjyouma M., Kohda H., Kawanishi F. and Hiraoka N., Phylogenetic analysis of *Atractylodes* Plants Base on Chloroplast *trnK* Sequence. *Biol. Pharm. Bull.*, **21** (5): 474-478, (1998).
- 29) Zhu S., Fushimi H., Cai S., Komatsu K., Phylogenetic Relationship in the Genus *Panax*: Inferred from Chloroplast *trnK* Gene and Nuclear 18S rRNA Gene Sequences. *Planta Med*, **69** (7): 647-653, (2003).
- 30) Yang D. Y., Fushimi H., Cai S. and Komatsu K., Molecular analysis of *Rheum* species used as rhei rhizoma based on the chloroplast *matK* gene sequence and its application for identification. *Biol. Pharm. Bull.*, **27** (3): 375-383, (2004).
- 31) Yang C. Y., Shen K. M. and Mao Z. M., Flora Xinjiangensis Tomus 1, Xinjiang Science & Technology & Hygiene Publishing House, Wulumuqi, (1992) (in Chinese).
- 32) 南基泰, 味岡ゆい, 土田貴志, シノ・ヒマラヤ地域におけるダイオウ基原植物の分子系統地理学的考察. *薬用植物研究*, **32**(2): 55-68, (2010).
- 33) Guo, Y., Tsuruga A., Yamaguchi S., Oba K., Iwai, K., Sekita, S. and Mizukami H., Sequence analysis of chloroplast *chlB* gene of medicinal *Ephedra* species and its application to authentication of ephedra herb. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**: 1207-1211, (2006).
- 34) Masada-Atsumi S., Onuma M., Suenaga E., Maruyama T., Hishida A., Kiuchi F., Kobayashi S., Goda Y. and Hakamatsuka T., Genome-based authentication of

- black cohosh (*Cimicifuga racemosa*; *Ranunculaceae*) supplements available in the Japanese markets, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **20** (3): 178-189, (2013).
- 35) Kitaoka F., Kakiuchi N., Long C., Itoga M., Mitsue A., Mouri C., and Mikage M., Molecular characterization of *Akebia* Plants and the derived traditional herbal medicine. *Biol. Pharm. Bull.*, **32** (4): 665-670, (2009).
- 36) Murata J., Oki H., Kakutani K., and Hashimoto T., Identification of DNA polymorphisms in *Angelica acutiloba*. *Plant Biotechnology*, **25**: 157-163, (2008).
- 37) 木谷友紀, 漢薬「麻黄」の資源開発を志向したモンゴル国産 *Ephedra* 属植物の遺伝子多型とアルカロイド成分に関する研究, 博士学位論文, 富山大学, 富山, (2010).
- 38) 国家薬典委員会編, 中華人民共和国薬典 2010 年版一部, 中国医薬科技出版社, 北京: PP.300-301.
- 39) 御影雅幸, 麻黄 (マオウ) の国内栽培を目指して, *特産種苗*, **16**: 53-57, (2013).
- 40) Krizevski, R., Bar, E., Shalit, O., Levy, A., Hagel, J. M., Kilpatrick, K. and Lewinsohn, E., Benzaldehyde is a precursor of phenylpropylamino alkaloids as revealed by targeted metabolic profiling and comparative biochemical analyses in *Ephedra* spp. *Phytochemistry*, **81**: 71-79, (2012).
- 41) Krizevski, R., Bar, E., Shalit, O., Sitrit, Y., Ben-Shabat, S., and Lewinsohn, E., Composition and stereochemistry of ephedrine alkaloids accumulation in *Ephedra sinica* Stapf. *Phytochemistry*, **71**(8): 895-903, (2010).
- 42) Long C. Kakiuchi N. Zhong G. and Mikage M., Survey on Resources of *Ephedra* Plants in Xinjiang. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(2): 285-288, (2005).
- 43) Matsumoto M., Hirayama M., Ohtomi N., Ohno T., Nomura Y., Iida O., Sugimura K., Kawahara N., Tsuchida T. and Mikage M., Influence of genetic factors on the ephedrine alkaloid composition ratio of *Ephedra* plants. *J. Nat. Med.*, **69**(1): 63-67, (2014).

謝辞

本研究は金沢大学大学院名誉教授・東京農業大学教授 御影雅幸 博士のご指導のもとに着手し、終始懇篤なる指導を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行からとりまとめに至るまで、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました 佐々木陽平 准教授に深甚なる謝意を表します。

また、三宅克典 助教には研究を進めるにあたりご助言、ご協力を賜りましたことを深謝いたします。

中国での調査に加え、アルカロイドの分析などご協力を賜りましたクラシエ製薬株式会社 松本昌士 博士に厚く御礼申し上げます。

また、日頃より種々励ましてくださいました資源生薬学研究室、分子生薬学研究室的の皆様方に感謝いたします。

最後に、これまで辛抱強く支援して下さった両親に対して深く感謝いたします。